

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 01-300889  
 (43)Date of publication of application : 05.12.1989

(51)Int.Cl. C12N 1/20  
 // C12N 15/00

(21)Application number : 63-132000 (71)Applicant : AJINOMOTO CO INC  
 (22)Date of filing : 30.05.1988 (72)Inventor : IKURA KOJI  
 SASAKI RYUZO  
 CHIBA HIDEO

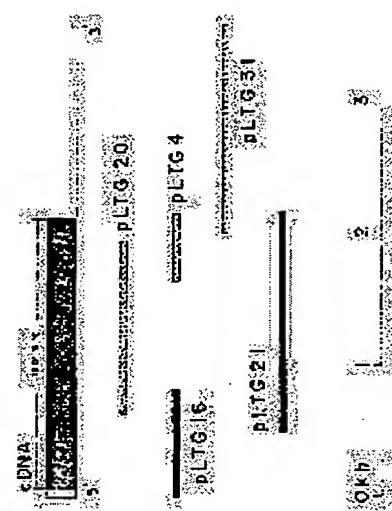
## (54) TRANSFORMANT AND PRODUCTION OF MTGASE USING SAME

### (57)Abstract:

**NEW MATERIAL:** A microorganism such as Escherichia coli transformed by a plasmid containing gene coding guinea pig liver transglutaminase (MTGase).

**USE:** For production of MTGase to modify nutrient value or physical properties by introducing various amino acids into food proteins so as to form covalent bond.

**PREPARATION:** For example, from clones from plural Escherichia coli containing the partially duplicate CDNA of MTGase, plasmid pLTG 16 and plasmid pLTG 21 are extracted and cut with a relevant restriction enzyme, and the resultant DNA fragments are fractionated by agarose electrophoresis followed by conjunction of the DNA fragments in the translational region coding MTGase using DNA ligase to produce a plasmid containing gene coding MTGase. Thence, this plasmid is incorporated into Escherichia coli to transform this Escherichia coli followed by culture of the resultant microorganisms, thus obtaining the objective recombinant MTGase.



### LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

1922  
W. H. DAVIS

[Date of extinction of right]

1950  
1951  
1952  
1953  
1954  
1955  
1956  
1957  
1958  
1959  
1960  
1961  
1962  
1963  
1964  
1965  
1966  
1967  
1968  
1969  
1970  
1971  
1972  
1973  
1974  
1975  
1976  
1977  
1978  
1979  
1980  
1981  
1982  
1983  
1984  
1985  
1986  
1987  
1988  
1989  
1990  
1991  
1992  
1993  
1994  
1995  
1996  
1997  
1998  
1999  
2000  
2001  
2002  
2003  
2004  
2005  
2006  
2007  
2008  
2009  
2010  
2011  
2012  
2013  
2014  
2015  
2016  
2017  
2018  
2019  
2020  
2021  
2022  
2023  
2024  
2025  
2026  
2027  
2028  
2029  
2030  
2031  
2032  
2033  
2034  
2035  
2036  
2037  
2038  
2039  
2040  
2041  
2042  
2043  
2044  
2045  
2046  
2047  
2048  
2049  
2050  
2051  
2052  
2053  
2054  
2055  
2056  
2057  
2058  
2059  
2060  
2061  
2062  
2063  
2064  
2065  
2066  
2067  
2068  
2069  
2070  
2071  
2072  
2073  
2074  
2075  
2076  
2077  
2078  
2079  
2080  
2081  
2082  
2083  
2084  
2085  
2086  
2087  
2088  
2089  
2090  
2091  
2092  
2093  
2094  
2095  
2096  
2097  
2098  
2099  
20100

訂正有り  
 ⑩日本国特許庁(JP) ⑪特許出願公開  
 ⑫公開特許公報(A) 平1-300889

⑬Int.Cl.  
 C 12 N 1/20  
 // C 12 N 15/00 識別記号 庁内整理番号 ⑭公開 平成1年(1989)12月5日  
 G-8515-4B  
 A-8717-4B 審査請求 未請求 請求項の数 3 (全8頁)

⑮発明の名称 形質転換体及びこれを用いるMTGaseの製造法

⑯特 願 昭63-132000  
 ⑰出 願 昭63(1988)5月30日

特許法第30条第1項適用 昭和63年4月2日 社団法人日本農芸化学会開催の「昭和63年度日本農芸化学会大会」において文書をもつて発表

⑱発明者 伊倉 宏司 京都府八幡市八幡山田26-1  
 ⑲発明者 佐々木 隆造 京都府京都市左京区田中東高原町14  
 ⑳発明者 千葉 英雄 京都府宇治市広野町新成田100-131  
 ㉑出願人 味の素株式会社 東京都中央区京橋1丁目5番8号

## 明 細 善

## 1. 発明の名称

形質転換体及びこれを用いるMTGaseの製造法

## 2. 特許請求の範囲

- (1) モルモット肝トランスグルタミナーゼ(以下MTGaseと略す)をコードする遺伝子を含有するプラスミドにより形質転換された微生物。
- (2) 微生物がエシェリヒア・コリである請求項(1)記載の微生物。
- (3) 請求項(1)又は(2)項記載の微生物を培地中で培養して目的とするリコンビナントMTGaseを生産させ、該リコンビナントMTGaseを培地中から採取することを特徴とするリコンビナントMTGaseの製造法。

## 3. 発明の詳細な説明

## &lt;産業上の利用分野&gt;

本発明はMTGaseをコードする遺伝子を含有するプラスミドにより形質転換された微生物及び該微生物によるリコンビナントMTGaseの製造法に関する

る。

## &lt;従来技術&gt;

モルモット肝トランスグルタミナーゼ(Protein-glutamine:amine  $\gamma$ -glutamyltransferase, EC2.3.2.13、以下TGaseと略す)はタンパク質の修飾酵素の一つであり、 $Ca^{2+}$ 依存性のアシル転移酵素である。基質としては、アシル供与体としてペプチド鎖中 Gln残基の  $\gamma$ -カルボキシアミド基が、アシル受容体としてアミン化合物の第1級アミノ基やペプチド鎖中 Lys残基の  $\epsilon$ -アミノ基がそれぞれ反応する。

尚、反応機構は以下のとおりである。

(3)

— 2 —

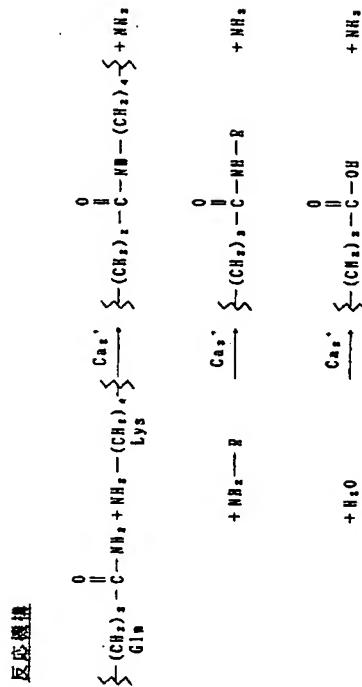
## 特開平1-300889(2)

即ち、この酵素が触媒する反応としては、ペプチド鎖中 Gln残基とペプチド鎖中 Lys残基との間でのε-(ターグルタミル)リジン架橋結合の形成、ペプチド鎖中 Gln残基へのアミン化合物の導入、あるいはアミン化合物非存在下でのペプチド鎖中 Gln残基の脱アミド反応である。

このTGaseは多くの動物の様々な部位で見つけられているが、この生理機能として知られているものはほとんどがタンパク質間架橋形成反応であり、血液凝固カスケード反応の最終ステップであるフィブリンモノマーの架橋重合による安定化、表皮組織の角質層における不溶性タンパク質の形成、毛タンパクの架橋形成、などである。

TGaseを利用すれば、蛋白質の生化学的研究、新しい酵素反応系の形成や、再利用可能な補酵素誘導体-カゼイン複合体の形成、さらには必須アミノ酸を導入することによって食品蛋白質の栄養価を改善することができ、従って大量入手する方法の開発が望まれている。

さて、現在TGaseを利用するにあたって良質な



酵素の給源としてモルモットの肝臓のTGase（以下MTGaseと略す）が用いられている。

しかしながら、MTGaseは質的には良好であるが、モルモット肝臓が供給源であることより取得できる量が限られていること、及び精製法が非常に複雑で収率が極めて悪いこと、更にはモルモット自体が非常に高価であることなどの欠点がある。従って、以前よりMTGaseを大量に、しかも安価に更には簡便に生産する方法の提供が望まれていた。

## &lt;本発明が解決しようとする課題&gt;

本解明が解決しようとする課題は、遺伝子工学的手法を用いて、微生物から大量に目的とするリコンビナントMTGaseを生産する方法の提供にある。

## &lt;本発明の課題を解決する為の手段&gt;

本発明者等は上記課題を解決すべく観察研究を行った結果、MTGaseをコードする遺伝子を含有するプラスミドにより形質転換された微生物を培養することにより、目的とするリコンビナントMTGaseを多量に生産せしめることができ、本発明を完成に至らしめた。

即ち、本発明は、MTGaseをコードする遺伝子を含有するプラスミドにより形質転換された微生物及び該微生物によるリコンビナントMTGaseの製造法である。

本発明を以下に詳細に説明する。

本発明者等は既にMTGaseの部分重複cDNAクローニングを複数個取得しており（第1図<sup>1</sup>）、これからMTGaseをコードするDNA配列及びMTGaseのアミノ酸配列を決定している（Agric. Biol. Chem. 51(3), 957-961頁（1987年））。これによると、MTGaseをコードするDNAは、開始コドン(ATG)と690残基のアミノ酸からなるコドンを含むものである（第2図<sup>2</sup>）。また本酵素の分子量は76,620と算定されている。さて、MTGaseを生産する微生物の調製であるが、まず、MTGaseをコードする遺伝子を微生物内で複製可能なプラスミドに組み込む。この時、MTGaseをコードする遺伝子を発現ベクターのプロモーター配列下流に挿入すればよい。組み込む方法は、プラスミドを適当な制限酵素で切断し、その切断部位に目的とするMTGaseをコ

## 特開平1-300889(3)

ードする遺伝子を挿入し、接続すればよい。このようにして得られた組み換えDNAを原核生物宿主に導入し、得られた形質転換微生物の中からMTGaseを生産する株を選べば良い。本発明において、組み換えDNAが導入される微生物宿主としてはエシエリヒア・コリ、バチルス・ズブチリス等を用いることができるが、好ましくはエシエリヒア・コリを用いるのが良い。

また、本発明に用いることができるエシエリヒア・コリ用ベクターとしてはEKタイププラスミドベクター（リラックス型）、EKタイププラスミドベクター（ストリングジェント型）、λgt1タイプファージベクター等々の種々のベクターを用いることができる。

またプロモーターとしてはtrpプロモーター、lacプロモーターを始めとするエシエリヒア・コリ内で機能するすべてのプロモーターが利用可能である。

組み換えDNAを用いた宿主細胞の形質転換には、通常よく用いられる次の方法がある。エシエリヒ

ア・コリの如き原核生物が宿主の場合、このDNAを取り込むことの出来るコンピテント細胞は対数増殖期における細胞を回収後、良く知られているCaCl<sub>2</sub>法によって形質転換できる。形質転換反応液中にMgCl<sub>2</sub>又はRbClを共存させれば形質転換効率は向上する。また宿主細胞のプロトプラス調製後形質転換させることも可能である。

形質転換された微生物を培養する培地および培養方法は通常の培地、方法でよい。すなわち培地としては炭素源、窒素源、無機イオン、さらに必要に応じアミノ酸、ビタミン等の有機微量栄養素を含有する通常のものである。

炭素源としてはグルコース、シュクロース等及びこれらを含有する澱粉加水分解物、糖蜜等が用いられる。窒素源としてアンモニアガス、アンモニア水、アンモニウム塩、その他が使用できる。より好ましくはペプトン、トリプトン、肉エキス、酵母エキス等の天然素材なども使われる。

培養は好気的条件下で培地のpH及び温度を適宜調節しつつ行なえば良い。

培養菌体より、リコンビナントMTGaseを採取するには、通常以下のような方法で行えれば良い。

即ち、培養菌体を冷却遠心機等で集菌した後、適当なバッファーに懸濁し、超音波あるいはダイノミルなどで菌体を破碎して抽出液を得る。この菌体抽出液を硫酸沈澱分離法、イオン交換クロマトグラフィー法、ゲル汎過法、抗体カラム法などを行ってリコンビナントMTGaseの精製標品が得られるわけである。

## (効 果)

本発明はモルモットの肝臓が供給源である為に①少量しかMTGaseを提供できない、②高価である、③精製操作が非常に煩雑である等の従来法の欠点を解消し得る画期的な方法である。換言すれば、本発明の方法を用いると、大量に、しかも、安く、更に、簡便にMTGaseを提供し得るのである。

このようにして得られたリコンビナントMTGaseは従来の天然型MTGaseと同様に、各種アミノ酸を食品蛋白質に共有結合的に導入することにより、栄養価や物性を改変することができる。また、本

標素は食品以外の医薬品、化成品への応用も期待できる。

以下、本発明を実施例に従って説明する。

## 〔実施例1：発現プラスミドpKTG1の構造〕

本発明者等は既にMTGaseの部分重複cDNAのクローン5個を取得しており（第1図參）、またこれを基にDNA配列及びアミノ酸配列を決定している（第2図參）。

さて、まず第1図に示したプラスミドpLTG1.6を含有するエシエリヒア・コリMC1061（以下、E.coli MC1061とする）及びプラスミドpLTG2.1を含有するE.coli MC1061より以下の方法に従ってプラスミドpLTG1.6及びプラスミドpLTG2.1を抽出した。

即ち、培養液100mlを遠心分離により菌体のみを集め、5.0mMTris-HCl, pH7.5の5mlに懸濁し-80℃に凍結後、融解して次にリゾチーム（最終濃度、2mg/ml）を加えて0℃で10分間静置し、さらにEDTA（最終濃度0.1M）を加え、0℃で10分間静置する。その後、Triton X

— 4 —

## 特開平1-300889(4)

-100 (最終濃度0.1%)を加えて0℃で60分間静置する。ついで30,000rpm、30分間遠心分離し、その上清液を等量の水飽和フェノールで処理する。その水層をさらに等量のクロロホルムで処理し、その水層を抽出し、これに最終濃度20μg/mlとなるようにRNaseを加え、37℃で60分間インキュベートした。

その後0.2容の5M NaClと1/3容のボリエチレングリコールを加え、0℃に60分間静置後、10,000rpm 20分間、遠心分離によりDNA沈殿を回収する。

次にこの沈殿を3.8mlの水に溶解し、4gのCsClを加えて溶解後、10mg/mlのEtBrの200μlを加えて40,000rpm、16時間、20℃で超遠心分離を行う。

遠心終了後、プラスミドDNA部分を抽出し、水飽和n-ブタノールの1~2容で4回抽出操作を行ってEtBrを除く。その後H<sub>2</sub>O中で透析を行ってCsClを除去後、3M酢酸ソーダpH5.6の1/10容を加え、さらに2容の冷エタノールを加えて、

1621Aを調製した。

## ii) プラスミド pLTG 1621B の構築

(イ) 上記 i) で得たプラスミド pLTG1621A を制限酵素 Sal I 及び Hind III で切断し、アガロース電気泳動分離により小さいDNA断片(約1440bp)を回収した。

(ロ) プラスミド pLTG 2 1 を制限酵素 Hind III 及び EcoRI で切断し、アガロース電気泳動分離により、小さいDNA断片(約740bp)を回収した。

(ハ) プラスミド pUC 9 (ファルマシア社製) を制限酵素 Sal I 及び EcoRI で切断し、アガロース電気泳動分離により、大きなDNA断片を回収した。

(ニ) 上記 (イ)、(ロ)、(ハ) で得たDNA断片をDNAリガーゼで連結させて、プラスミド pLTG1621B を構築した。

## iii) プラスミド pUTG 1 の構築

(イ) 上記 ii) で得たプラスミド pLTG1621B を制限酵素 Hco I 及び Bst E II で切断し、アガロ-

-20℃で一晩静置する。このエタノール沈殿を遠心分離で集めて80%エタノール水溶液で洗浄後、よく乾燥し、この沈殿物を50μlの1 mM EDTAを含む10mM Tris-HCl, pH 7.5に溶解しサンプルとした。

プラスミド pLTG 1 6 及びプラスミド pLTG 2 1 より MTCase 発現プラスミド pKTG 1 を構築した(第3及び4図)。以下に、その詳細を示した。

## i) プラスミド pLTG 1621A の構築

(イ) さて、プラスミド pLTG 1 6 を制限酵素 Bss I 、 Hind III で切断し、アガロースゲル電気泳動分離により大きい方のDNA断片を回収した。尚第3図及び第4図において制限酵素で切断したDNA断片の内、使用したDNA断片は破壊で示した。

(ロ) プラスミド pLTG 2 1 を制限酵素 Bss I 及び Hind III で切断し、アガロースゲル電気泳動分離により、約740bpのDNA断片を回収した。

(ハ) 上記 (イ) 及び (ロ) で得たDNA断片をDNALリガーゼを用いて連結させ、プラスミド pLTG

ス電気泳動分離により約370bpのDNA断片を回収した。

(ロ) 上記 ii) で得たプラスミド pLTG1621B を制限酵素 Bst E II 及び Sal I で切断し、アガロース電気泳動分離により小さい方のDNA断片(約1700bp)を回収した。

(ハ) プラスミド pUC 118 N (京大、ウィルス研牧先生より分譲された) を制限酵素、Nco I 及び Sal I で切断し、アガロース電気泳動分離により、大きい方のDNA断片を回収した。

(ニ) 前記 (イ)、(ロ)、(ハ) で得たDNA断片をDNALリガーゼにより連結させてプラスミド pUTG 1 を構築した。

## iv) プラスミド pKTG 1 の構築

(イ) 上記 iii) で得たプラスミド pUTG 1 を制限酵素 Hco I 及び Bst E II で切断し、アガロース電気泳動分離により約370bpのDNA断片を回収した。

(ロ) 上記 iii) で得たプラスミド pUTG 1 を制限酵素 Bst E II 及び Pst I で切断し、アガロース電

## 特開平1-300889(5)

気泳動分画により小さい方のDNA断片(約1700 bp)を回収した。

(ハ) trc プロモーター ( trp プロモーター及び lac プロモーターの融合したもの) 及びアンピシリン抵抗性を有するプラスミド pKK233-2 (ファルマシア社製) を制限酵素 Nco I 及び Pst I で切断し、アガロース電気泳動分画により、大きなDNA断片を回収した。

(ニ) 上記(イ)、(ロ)、(ハ)で得たDNA断片をDNAリガーゼを用いて連結させてMTGase発現プラスミド pKTG 1 を構築した。

即ち、以上の操作を処することにより、2種類の重複するcDNAを有するプラスミド pLTG 1.6 及び pLTG 2.1 からMTGaseをコードする全DNA配列(開始コドンATGから終止コドンTAAまで)を含有するプラスミド pKTG 1 を構築したわけである。

(実施例2 大腸菌によるリコンビナントMTGaseの生産)

i) 実施例1で作成した

プラスミド pKTG 1 を保持するエシェリヒア・コリ JM103 株を用いた。

結果は第5図に示した。

これからも分るようにプラスミド pKTG 1 を含有するエシェリヒア・コリ JM103 株 (PERM P-10008) は菌体内にリコンビナント MTGase を生産していた。

Ⅱ) 上記 i) により菌体内にMTGase蛋白が生産されていることを確認したので、このリコンビナント MTGase を以下のように抽出した。即ち、上述の懸濁液にソニック処理 (20キロサイクル、300秒) を行ない、抽出した。

この抽出液はトランスグルタミナーゼ活性を示した(第6図)。尚、コントロールとして、プラスミド pKK233-2 で形質転換したエシェリヒア・コリ JM103 株より同様の方法で抽出した抽出液を用いた。

第6図より分るように MTGase は  $\text{Ca}^{2+}$  依存性酵素である。尚、 $\text{Ca}^{2+}$  が存在しないと、たとえ PERM P-10008 の抽出液であってもトランスグルタミナーゼ活性は示さない。

尚、トランスグルタミナーゼ活性の測定は以下の方法を行った。

JM103株 (PERM P-10008) を  $50 \mu\text{g}/\text{ml}$  アンピシリンを含む Z YT 培地 (1.6% バクトリプトン、1.0% 酵母エキス、1.0% NaCl, pH 6.7)  $1.0 \text{ ml}$  中で 37℃, 12時間培養した。

その後、誘導剤として、イソプロピルチオガラクトシド (IPTG)  $0.2 \text{ mM}$  添加して 5 時間培養した。培養菌体を遠心分離により集め、 $0.15\text{M}\text{ KCl}$   $2 \text{ mM EDTA}$ ,  $0.2 \text{ mM DTT}$  を含む  $2.0 \text{ mM}$  トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5) で洗浄した後、同じ緩衝液  $3.0 \text{ ml}$  に懸濁した。

この菌園菌体の一部をとり、1% SDSで溶融し、その抽出液の一部を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供した。コントロールとして、モルモット肝より精製したMTGase標品及びプラスミド pKK233-2 で形質転換されたエシェリヒア・コリ JM103 株を用いた。

この電気泳動したアクリルアミドゲルをニトロセルロース膜に写しとり、抗MTGase抗体で反応させた後にペーオキシダーゼを結合した2次抗体と反応させた。このウェスタンブロッティングの結果は第5図に示した。

$5 \text{ mg}/\text{ ml}$  アセチル $\alpha_{\text{L}}$ -カゼイン、 $0.13\text{mM}$  [ $^3\text{H}$ ] ブトレシン、 $50 \text{ mM}$  トリス-塩酸 (pH 7.5),  $5 \text{ mM CaCl}_2$ ,  $1.0 \text{ mM DTT}$  および抽出液を含む反応液 ( $15.0 \mu\text{l}$ ) を  $37^\circ\text{C}$  でインキュベートし一定時間ごとに一定量の反応液 ( $2.0 \mu\text{l}$ ) をペーパーディスク上にスポットする。未反応の [ $^3\text{H}$ ] ブトレシンをトリクロール酢酸で洗浄した後に、ペーパーディスク上に固着したアセチル $\alpha_{\text{L}}$ -カゼインに取り込まれた放射能をシンチレーションカウンターで測定した。

(L. Lorand et al.: Anal. Biochem., 50, 623-631 (1972)) に基本的にしたがっている。

(実施例3 モノクロナール抗体カラムによるリコンビナントMTGaseの精製)

実施例2 ii) で得た抽出液  $3.0 \text{ ml}$  を抗MTGaseモノクロナール抗体カラム ( $1.4 \text{ cm} \times 6 \text{ cm}$ ) にアブライした。

TBS バッファー ( $2.0 \text{ mM}$  トリス-塩酸 (pH 7.5),  $0.15\text{M}\text{ KCl}$ ,  $0.2 \text{ mM DTT}$ ,  $2 \text{ mM EDTA}$ )  $1.0 \text{ l}$  で洗浄した後、溶出バッファー ( $2.0 \text{ mM NaHCO}_3$ ,

## 特開平1-300889(6)

-NaOH (pH 10.4)、0.4 mM DTT、2 mM EDTA、2 M KCl) 40 mL で目的とするリコンビナント MTGaseを溶出した。

溶出液を20 mLのカウンターベッファー(1 M Tris-HCl (pH 7.5, 0.4 mM DTT, 2 mM EDTA) で中和した。

その後、紫外線過処理を行うことにより、精製リコンビナントMTGaseを得た。

確認の為に SDS-PAGEを行ったところ均一なバンドが得られた。この単離したリコンビナント MTGaseのトランスクレタミナーゼ活性を測定すると、その比活性は1690ユーニット/mg×10<sup>4</sup> であった。

## 4. 図面の簡単な説明

第1図は、MTGase cDNAの翻訳領域及び、各遺伝子領域を含むクローンを示す。

第2図はMTGaseのアミノ酸配列及びMTGaseをコードするDNA配列を示す。

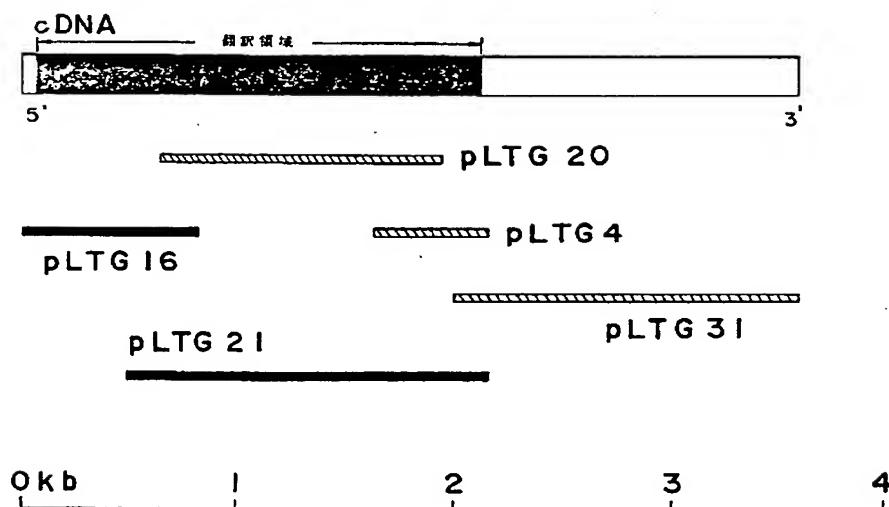
第3図はプラスミドpLTG1621Bの構築図を示す。

第4図はプラスミドpETG1の構築図を示す。

第5図はプラスミドpETG1により形質転換させたエシテリヒア・コリJM103株(FERM P-10008)のウェスタンプロッティングを示す。

第6図は培養した FERM P-10008 抽出液のトランスクレタミナーゼ活性を示す。

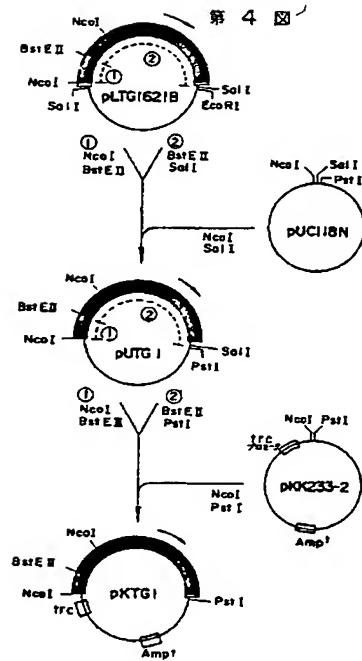
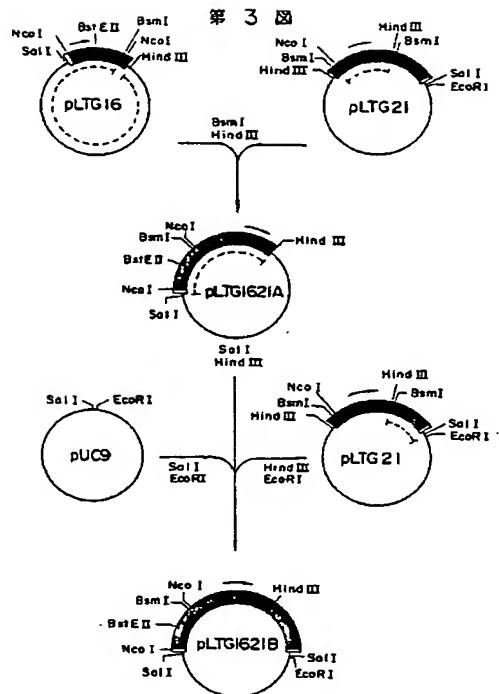
第1図



特開平1-300889(7)

第 2 四

特開平1-300889(8)



第6図

第5図

